

⑩ 日本国特許庁(JP)

訂正有り

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-97397

⑤ Int. Cl.⁵C 12 P 21/02
C 07 K 13/00
C 12 N 15/12

識別記号

ZNA

庁内整理番号

C 8214-4B
8318-4H

⑬ 公開 平成2年(1990)4月9日

※

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全8頁)

⑭ 発明の名称 細胞接着活性ポリペプチド

⑰ 特 願 昭63-160949

⑱ 出 願 昭63(1988)6月30日

⑲ 発 明 者 君 塚 房 夫 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
究所内⑲ 発 明 者 後 藤 晶 一 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
究所内⑲ 発 明 者 大 館 洋 一 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
究所内⑲ 発 明 者 嵐 田 雅 光 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
究所内

⑳ 出 願 人 寶酒造株式会社 京都府京都市伏見区竹中町609番地

㉑ 代 理 人 弁理士 中 本 宏 外2名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

細胞接着活性ポリペプチド

2. 特許請求の範囲

1. 下記一般式I:

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly
 Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro
 Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu
 Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser
 Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser
 Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile
 Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile
 Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly
 Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser
 Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr

Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
 Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu
 Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
 Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp
 Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser
 Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser
 Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr
 Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala
 Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 Thr Glu Ile Asp ... [I]

で表されるアミノ酸配列で示されることを特
 徴とする細胞接着活性ポリペプチド。

2. 請求項1記載の細胞接着活性ポリペプチド
 をコードするDNAを含有せしめた組換体プ
 ラスミド。

3. 請求項2記載の組換体プラスミドを導入せ
 しめた形質転換体。

4. 請求項3記載の形質転換体を培養し、該培養物より請求項1記載の細胞接着活性ポリペプチドを採取することを特徴とする細胞接着活性ポリペプチドの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、フィブロネクチン様の細胞接着活性タンパク質に関し、更に詳しくは、ヒトフィブロネクチンの細胞接着活性を有するポリペプチド及びその製造方法に関する。

〔従来の技術〕

フィブロネクチンは、動物の種々の組織や体液中、また、培養細胞表面などに広く分布する多機能糖タンパク質であり、細胞の接着、伸展、移動、分化、増殖、貪食作用などの生理作用を示し、組織修復、組織構築、生体防御などに関与していることが知られている。

フィブロネクチンは、分子量約25万のポリペプチドがC末端付近でS-S結合で2量体を形成している。分子内アミノ酸配列は、繰返し

(3)

ブチドの細胞接着活性は、天然のフィブロネクチンに比べて非常に弱く、前記の用途として用いるには必ずしも実用的とはいえない。このことについては、例えばジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.) 第260巻、第13256～13260頁(1985)に記載されている。また、本発明者らは、前記分子量1.15万のポリペプチドを遺伝子工学的に製造し、そのNRK細胞(ラット腎細胞)に対する細胞接着活性を、天然のフィブロネクチンと比較した。その結果、フィブロネクチンは0.1～1 μ g/ウェルで活性がみられたのに対し、分子量1.15万のポリペプチドでは50 μ g/ウェルでも活性は認められなかつた。

本発明の目的は、フィブロネクチンの細胞結合ドメインペプチドとして、新たに細胞接着活性を有するアミノ酸配列を明らかにし、その製造方法を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

本発明を概説すれば、本発明の第1の発明は

(5)

構造を有し、I、II、III型に分けられる。更に、種々の機能を有するドメイン構造を有し、細胞接着、コラーゲン、ヘパリン及びフィブリン等に対する結合活性を示す。これらのドメインのうち、細胞接着ドメインについては、その生物活性から産業上の利用が考えられており、例えば、培養基質のコーティング剤として、細胞が付着する基質の調製に使用することができる。また、細胞付着の促進剤として、点眼液、ローション、外傷治療薬等を使用することができる。

フィブロネクチンの細胞接着ドメインの基本構造については、その最小必要単位としてR-G-D-S配列が明らかにされており〔ノーチャー (Nature) 第309巻、第30～33頁(1984)〕、この配列を含む108アミノ酸残基からなる分子量1.15万のポリペプチドが、細胞接着活性ペプチドとして特表昭59-501548号公報に記載されている。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら、この分子量1.15万のポリペ

(4)

細胞接着活性ポリペプチドに関する発明であつて、下記一般式1:

```
Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly
Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro
Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu
Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser
Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser
Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile
Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile
Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly
Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser
Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu
Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
```

(6)

Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
 Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp
 Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser
 Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser
 Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr
 Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala
 Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 Thr Glu Ile Asp ... [1]

で表されるアミノ酸配列で示されることを特徴とする。

また本発明の第2の発明は前記一般式Iで表される細胞接着活性ポリペプチドをコードするDNAを含有せしめた組換え体プラスミドに関し、また本発明の第3の発明は前記組換え体プラスミドを導入せしめた形質転換体に関する。更に本発明の第4の発明は前記形質転換体を培養し、該培養物より前記一般式Iで表される細胞接着活性ポリペプチドを採取する細胞接着活性ポリ

(7)

領域のアミノ酸配列によつてペプチドの発現が著しく変化することを見出し、接着活性が強く、かつ大量発現に適したペプチドの配列として、例えば、279アミノ酸残基ペプチド(Pro¹²³⁹-Met¹⁵¹⁷)を明らかにし、それらの遺伝子工学的製造法を開発して、既に特許出願した(特願昭63-31820号)。

本発明者らは更に研究を進め、279アミノ酸残基ペプチド(Pro¹²³⁹-Met¹⁵¹⁷)のC末側5アミノ酸残基を欠失させた274アミノ酸残基ペプチド(Pro¹²³⁹-Asp¹⁵¹²)を遺伝子工学的に調製し、その細胞接着活性を測定してFNと実質上ほぼ同等の活性があることを明らかにした。本発明はこれらの知見に基づいて達成された。

以下本発明を具体的に説明する。

279アミノ酸残基ペプチド(Pro¹²³⁹-Met¹⁵¹⁷)をコードするプラスミドの調製については、特願昭63-31820号明細書に記載された方法により行うことができる。

(9)

ペプチドを製造する方法に関する。

本発明者らは、ヒトフィブロネクチン(以下、FNと略記する)の細胞接着活性ポリペプチドとして特許出願されている1.5 kD(108アミノ酸残基)のポリペプチドには細胞接着活性がほとんどないが、そのN末を伸長した283アミノ酸残基ペプチド(Ala¹²³⁵-Met¹⁵¹⁷)にはFNと同等の接着活性があることを見出し、その遺伝子工学的製造法を開発して既に特許出願した(特願昭63-148号)。

なお、本明細書において、アミノ酸に付された肩数字は、EMBLデータベース(EMBL DATA BANK)のFNアミノ酸に付与されたN末からのアミノ酸残基数を示す。

更に本発明者らは283アミノ酸残基ペプチドのN末側から、アミノ酸又はペプチド配列を欠失した鎖長の異なる細胞接着ドメインペプチドを遺伝子工学的に調製し、それらの細胞接着活性を測定してペプチドの鎖長と接着活性の詳細な関係を明らかにした。更にその過程でN末

(8)

FNのAla¹²³⁵-Met¹⁵¹⁷をコードするPTF 301の開始コドンの少し上流の一箇所を適当な制限酵素で切断した後、エキソヌクレアーゼを作用させて、5'側の配列を除去することができる。反応条件を変えることにより、コード領域の5'末端が適当に除去されたプラスミドが得られる。これらのプラスミドのコード領域の終止コドンの少し下流の1箇所を適当な制限酵素で切断し、断片化したDNAをゲル電気泳動で精製することにより、5'末端が種々の部位まで除去されたcDNA断片が得られる。これらのcDNA断片を適当な発現ベクターに接続することにより、Ala¹²³⁵-Met¹⁵¹⁷(283アミノ酸残基)のN末領域が除去された種々の鎖長のペプチドを発現させることができる。

発現ベクターとしては、既存のすべてのベクターを使用することができるが、本発明者らは、リボゾーム結合部位と開始コドンの距離を最適化したpUC系ベクターを用いる直接発現で好結果を得ている。

(10)

更に、pUC系ベクターの終止コドンの下流に転写終結シグナルを接続することにより、発現レベルを向上させることが可能である。

細胞接着活性ペプチドが発現されている組換体の選択は、イムノスクリーニングによつて行うのが好都合である。すなわち、鎖長の異なるcDNA断片を接続した発現ベクターを常法により大腸菌に導入し、得られた形質転換体をニトロセルロースフィルター上で生育させ、溶菌後、菌体タンパク質をフィルター上に固定させる。フィルターをウシ血清アルブミン等でブロックした後、FNの細胞接着ドメインを認識するモノクローナル抗体を作用させる。フィルターに結合したモノクローナル抗体を、標識2次抗体で検出する。このようにして、細胞接着ドメインペプチドを発現している組換体を選択することができる。

次に、選択された組換体が発現に適した条件下に培養し、細胞接着ドメインペプチドの発現を誘導する。発現の確認には、イムノブロッテ

03

基目のLys¹⁵¹²のコドンAAAを終止コドンTAAに変換することにより274アミノ酸残基ペプチド(Pro¹²²⁹-Asp¹⁵¹²)をコードするプラスミドを調製することができる。この塩基の交換は、部位特異的変異の導入により行うことができる。

組換体からの細胞接着ドメインペプチドの精製は、例えば次のようにする。菌体ペレットをバッファーに懸濁し、超音波処理により可溶性画分と不溶性画分に分ける。後者は更に7M尿素を含むバッファーで可溶化する。可溶性画分を集めて、イムノブロッティングに用いた抗体を結合させたセファロース4Bのカラムにかけ、アフィニティ精製を行う。溶出にはpH 2.3付近のバッファーを用いる。イムノブロッティングで目的画分を集めることにより、細胞接着ドメインペプチドを得ることができる。必要とあれば、FPLC又はHPLCで更に精製することができる。

得られた細胞接着ドメインペプチドは、NRK細胞(正常ラット腎細胞)に対する細胞接着活性の測定に用いる。試料をバッファーに溶かして、

03

イングの手法が用いられる。すなわち、培養菌体の全タンパク質をSDSを含むバッファー中で加熱溶解し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で分離し、泳動パターンを、ニトロセルロースやナイロンメンブランに移し取る。メンブランに、FNの細胞接着ドメインに特異的なモノクローナル抗体を作用させ、次いで酵素標識第2抗体を作用させて、結合した抗体の酵素活性を、発色基質で発色させることにより、細胞接着ドメインペプチドのバンドを確認することができる。

更に、得られたクローンについて挿入断片5'側の塩基配列を解析することにより、発現しているペプチドのN末端を同定することができる。

274アミノ酸残基ペプチド(Pro¹²²⁹-Asp¹⁵¹²)を遺伝子工学的に調製する方法としては、以上の実験により得られた、279アミノ酸残基ペプチド(Pro¹²²⁹-Met¹⁵¹⁷)をコードするプラスミドpTFD 707を用いるのが好都合である。279アミノ酸残基ペプチドのC末端より5残

04

マイクロプレートに吸着させた後、NRK細胞を添加し、37℃で一定時間インキュベートする。顕微鏡下で細胞の伸展を観察し、伸展活性を発現するウェル当りの最少量を天然のFNと比較することにより、細胞接着活性の強さを表すことができる。

以上の一連の実験により、前記一般式Iで表される配列を有する274アミノ酸残基ペプチド(Pro¹²²⁹-Asp¹⁵¹²)がFNと実質上ほぼ同等の細胞接着活性を示すことが明らかとなった。
[実施例]

以下、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。

参考例1

279アミノ酸残基ペプチド(Pro¹²²⁹-Met¹⁵¹⁷)をコードするプラスミドpTFD 707及びpTF 7021の構築

279アミノ酸残基ペプチドをコードするプラスミドpTFD 707及びpTF 7021の構築方法については、特願昭63-31820号明細書

04

に詳細に記載されている。以下これを概説する。
283 アミノ酸残基ペプチド (Ala¹²³⁵-Met¹⁵¹⁷)
をコードするプラスミド pTF301 を XbaI で分
解した後、BAL 31 スクレアーゼ-8 を作用さ
せ、経時的にサンプリングした。サンプリング
した反応液を1つにまとめ、DNA を精製、回
収し、クレノウ酵素により末端を修復した後、
HindIII で分解、これをアガロースゲル電気泳動
にかけ、0.5 kb ~ 0.8 kb に相当する断片を回
収した。この DNA 断片に、リン酸化 NcoI リ
ンカー d(pAGCCATGGCT) を T4 DNA リガーゼに
より接続し、NcoI 及び HindIII にて分解後、セ
ファロース CL-4B のカラムにかけて遊離のリン
カーを除出した。得られた DNA 断片を、あら
かじめ NcoI 及び HindIII で処理して脱リン酸した
プラスミド pUC119N に接続し、大腸菌 HB101
を形質転換した。得られた形質転換体をアンピ
シリン含有 L 寒天培地上のニトロセルロースフ
ィルターに移し、37℃ にて培養し、生育した
コロニーをクロロホルム蒸気中に接触させた後、

05

多いペプチドが 279 アミノ酸残基ペプチドで
あり、これを pTFD707 と命名した。更に、
pTFD707 に含まれる、ベクター由来の Ala に
対応する配列 (GCT) を部位特異的変異の手法
(特願昭 63-148 号) により除去した。更
に、発現レベルを上げるために、分泌発現ベク
ター pIN₃-ompA1 から lpp ターミネーター配
列を HindIII-SalI 断片として取出し、pTFD
707 の HindIII-SalI サイトに接続して、pTF
7021 を構築した。

実施例 1

274 アミノ酸残基ペプチド (Pro¹²³⁵-Asp¹⁵¹²)
をコードするプラスミドの構築

pTFD707 への部位特異的変異の導入は、ク
ンケル (kunkel) らの方法 [プロシーデイン
グズ オブ ザ ナショナル アカデミー オ
ブ サイエンス オブ ザ U.S.A. (Proceed-
ings of the National Academy of Sciences
of the U.S.A.) 第 82 巻、第 488 ~ 492
頁 (1985)、メソツズ イン エンザイモ

07

リゾチーム、DNase I 処理、BSA によるプロ
ツキングを行つた。フィルターに FN の細胞接
着ドメインを特異的に認識する抗 FN モノクロ
ーナル抗体 FN-10 [宝酒造(株)販売]、次い
でペーオキシダーゼ標識第 2 抗体を作用させ、
過酸化水素と 4-クロロ-1-ナフトールの存
在下で発色させることにより、発現している形
質転換体を選別した。得られたクローンを L-
ブロスで振とう培養後、全菌体タンパク質を
SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S
DS-PAGE) で分離し、抗 FN モノクローナル
抗体 FN-10 と反応する、22 kDa ~ 32 kDa
のポリペプチドが生産されていることを確認し
た。これらのうち、11 クローンについて挿入
断片 5' 側の塩基配列を決定したところ、C 末端
を Met¹⁵¹⁷ として、それぞれ 279、258、
219、213、207、206、198、
195、190、186、178 アミノ酸残基
をコードしていた。これらのペプチドの発現量
を SDS-PAGE で比較したところ、最も発現量の

06

ロジ- (Methods in Enzymology) 第 154 巻、
第 367 ~ 382 頁] に準じて構成された、サ
イト-ダイレクテッド ムタゲネシス システ
ム ミュータン-K (Site-directed mutage-
nesis system Mutan-K) [宝酒造(株)販売]
を用いて行つた。

pTFD707 を大腸菌 BW313 に導入し、50
μg/ml のアンピシリンを含む 100 ml の 2 × YT
培地 (1.6 % バクトトリプトン、1 % 酵母エキ
ス、0.5 % NaCl) で 37℃ にて振とう培養し
た。660 nm の吸光度が 0.3 の時点で 10¹⁰
pfu/ml の M13K07 フアージ液 1 ml を加え、更
に 37℃ で 16 時間培養を続けた。遠心分離に
より上清を回収し、2.5 M NaCl、20 % ポリ
エチレングリコール + 6000 の 2.5 ml を加え、
室温で 10 分放置した。遠心分離し、沈殿を 5
ml の TE バッファー [10 mM トリス (Tris)-
HCl、pH 8.0、1 mM EDTA] に溶解し、フェ
ノール：クロロホルム処理、更にクロロホルム
処理後、エタノール沈殿により一本鎖 DNA を

08

回収した。得られた一本鎖 DNA 30 ng を、1 μ L のアニーリングバッファー (20 mM トリス・HCl、pH 8.0、10 mM MgCl₂、50 mM NaCl、1 mM DTT) に溶解し、あらかじめリン酸化したオリゴヌクレオチド d[$\overline{\text{pGGATGGTTA GTCAATTTTC}}$] 1 pmol を含む 1 μ L の溶液を加え、65 $^{\circ}\text{C}$ 15 分、37 $^{\circ}\text{C}$ 15 分静置した。これに、25 μ L の伸長バッファー (50 mM トリス・HCl、pH 8.0、60 mM 酢酸アンモニウム、5 mM MgCl₂、5 mM DTT、1 mM NAD、0.5 mM dATP、dGTP、cCTP、dTTP)、60 ユニットの *E. coli* DNA リガーゼ、1 ユニットの T4 DNA ポリメラーゼを加え、25 $^{\circ}\text{C}$ 2 時間静置し、3 μ L の 0.2 M EDTA、pH 8.0 を加え、65 $^{\circ}\text{C}$ 5 分静置した。反応液 3 μ L と、大腸菌 BMH71-18 mutS コンピテントセル 30 μ L を混合し、0 $^{\circ}\text{C}$ 30 分、42 $^{\circ}\text{C}$ 45 秒、0 $^{\circ}\text{C}$ 2 分静置した。これに 300 μ L の L-プロスを加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 1 時間静置し、次いで、10 μ L の M13K07 フアージ液を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 30 分静置

(4)

した。得られた 0.5 kb フラグメント 5 ng、2.1 kb フラグメント 20 ng、2.4 kb フラグメント 20 ng を含む 3 μ L の溶液に、12 μ L の DNA ライゲーションキット [宝酒造 (株) 販売] A 液、3 μ L の B 液を加え、16 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分インキュベートした。反応液 10 μ L を用いて大腸菌 JM109 を形質転換し、FN の Pro¹²²⁹-Asp¹³¹² (274 アミノ酸残基) をコードし、1pp のターミネーター配列をもつプラスミドを得、pTF7221 と命名した。pTF7221 を導入した大腸菌 JM109 を *Escherichia coli* JM109 / pTF7221 と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した [微工研条寄第 1915 号 (FERM BP-1915)]。

JM109 / pTF7221 を培養して、細胞接着活性ポリペプチドの発現を調べたところ、全菌体タンパク質の少なくとも 30 % の発現が認められた。

実施例 2

274 アミノ酸残基ペプチド (pro¹²²⁹-Asp¹³¹²)

し、更に 150 μ g/ μ L のアンピシリン、70 μ g/ μ L のカナマイシンを含む 2 \times YT 培地 1 μ L を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 16 時間振とうした。遠心分離により、上清を回収し、得られた上清 20 μ L と、大腸菌 JM109 の終液培養液 80 μ L を混合し、37 $^{\circ}\text{C}$ 10 分静置した後、一部を 50 μ g/ μ L のアンピシリンを含む L-寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}\text{C}$ で一夜静置した。得られた組換体のうち 6 クローンについて塩基配列の解析を行つたところ、5 クローンに目的の変異が認められた。得られた組換体プラスミドを pTFD707-45 と命名した。

2 μ g の pTFD707-45 を BamHI 及び HindIII で分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、0.5 kb のフラグメントを回収した。一方、2 μ g の pTF7021 を BamHI 及び ScaI で分解し、アガロースゲル電気泳動し、2.1 kb のフラグメントを回収した。更に、2 μ g の pTF7021 を HindIII 及び ScaI で分解し、アガロースゲル電気泳動にかけ、2.4 kb のフラグメントを回収

(4)

の精製

FN の Pro¹²²⁹-Asp¹³¹² (274 アミノ酸残基) をコードする DNA を発現ベクターに接続して得られたプラスミド pTF7221 を導入した *Escherichia coli* JM109 / pTF7221 を、50 μ g/ μ L のアンピシリンを添加した 5 μ L の L-プロスを含む試験管で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、一夜振とう培養した。これを 500 μ L の同培地を含む 2 L の三角フラスコに接種し、180 r.p.m で培養を続けた。660 nm の吸光度が 0.3 の時点で 2 mM の IPTG (イソプロピル- β -チオガラクトシド) を添加し、20 時間後に集菌した。菌体の一部を用いてイムノブロッティングを行つた。すなわち、全菌体タンパク質を SDS-PAGE で分離し、泳動パターンをニトロセルロースメンブランに転写した後、FN の細胞接着ドメインを特異的に認識するモノクローナル抗体 [FN-10、宝酒造 (株) 販売] を作用させ、次いでパーオキシダーゼ標識第 2 抗体を作用させた。結合した第 2 抗体のパーオキシダーゼ活性を 4-クロロ

ナフトールと過酸化水素の存在下で発色させ、279アミノ酸より低分子側34kD付近に目的のバンドを確認した。次に、全固体ペレットを10mM トリスHCl (pH 7.5)、5mM EDTA、5mM メルカプトエタノールを含む溶液に懸濁して超音波処理を行つた。遠心分離により上清を採取し、20mM トリスHCl (pH 7.5) に対して透析した。透析内液をモノクローナル抗体FN-10を結合させたセファロース4Bのカラム(8ml)に通した。カラムを洗浄バッファーA(20mM トリスHCl、pH 8.0、0.15M KCl)で洗浄し、更に洗浄バッファーB(20mM トリスHCl、pH 6.4、0.15M KCl)で洗浄した。最後に溶出バッファー(50mM グリシンHCl、pH 2.3、0.2M KCl)で溶出し、分画した。イムノブロッティングにより目的画分を集め、脱塩、凍結乾燥して、電気泳動的にほぼ単一なペプチド約5μgを得た。次いで該ペプチドをアミノペプチダーゼP(1983年、朝倉書店発行、酵素ハンドブック、第534頁

23

多B8Aを100μL加え、37℃、1時間インキュベートして、プレートをブロックした。PB8で2回プレートを洗浄した後、あらかじめイーグルの最小培地(MEM)に10⁵細胞/μLとなるように懸濁させたラット腎細胞(NRK-49F)を100μL/ウェルの割合で分注し、37℃で2〜3時間インキュベートした。なお、使用したNRK-49F細胞は、凍結保存した株を前培養した後、トリプシン処理したものをを用いた。顕微鏡下で細胞の伸展を観察し、細胞接着活性に必要な最少量を決定した。その結果を第1表に示す。

第 1 表

ポリペプチド	(アミノ酸残基)	最少細胞接着活性 μg/ウェル (pmole/ウェル)	
Ile ¹¹⁰ -Met ¹¹⁷	(108)	>50	(4400)
Pro ¹³³ -Asp ¹³²	(274)	0.03	(1.0)
Pro ¹³³ -Met ¹³⁷	(279)	0.03	(1.0)
FN	(2324)	0.18	(0.8)

24

参照)処理を行い、N末のMetを除去後、前述の方法によりペプチドを再精製した。本ペプチドのN末端から約10アミノ酸残基のアミノ酸配列を調べたところ、Pro-Thr-Asp-Leu-Arg-Phe-Thr-Asn-Ile-Glyの配列が確認され、目的ペプチドのN末端配列と一致した。

実施例3

細胞接着活性の測定

前記実施例2で得られた274アミノ酸残基ペプチド、279アミノ酸残基ペプチド(特願昭63-31820号)及びFNの細胞接着活性をルオスラーティ(Ruoslahti)らの方法[メソツズ イン エンザイモロジー(Methods in Enzymology)第82巻、第803〜831頁(1981)]に準じて測定した。試料を生理食塩水又は蒸留水に溶かして段階的に希釈し、その50μLを96穴マイクロプレートに分注し、4℃、一夜インキュベートして、試料をプレートに吸着させた。次に、PB8(リン酸緩衝化生理食塩水)でプレートを2回洗浄し、3

24

〔発明の効果〕

以上詳細に説明したように、本発明により、FNと実質上同等の細胞接着活性を有するポリペプチド、及びその遺伝子工学的な製造方法が提供された。上記ポリペプチドは創傷治癒、点眼薬、ガン転移防止、人工臓器の人体への定着剤等の医薬品として、また化粧品、歯磨等に使

特許出願人	實 酒 造 株 式 会 社
代 理 人	中 本 宏
同	井 上 昭
同	吉 嶺 桂

25

第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. ⁵

// A 61 K 7/00
7/16
37/04

識別記号

庁内整理番号

J **7306-4 C**
 6971-4 C

ABL
ADA
ADT
ADU
AGA

8615-4C

(C 12 P 21/02
C 12 R 1:91)

⑫発 明 者 加 藤 郁 之 進 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央研
究所内

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成6年(1994)12月6日

【公開番号】特開平2-97397

【公開日】平成2年(1990)4月9日

【年通号数】公開特許公報2-974

【出願番号】特願昭63-160949

【国際特許分類第5版】

C12P 21/02 C 8214-4B

C07K 13/00 ZNA 8318-4H

C12N 15/12

// A61K 7/00 J 9051-4C

7/16 7252-4C

37/04 ABL

ADA 8314-4C

ADT

ADU

AGA

(C12P 21/02

C12R 1:91)

手続補正書 (自発)

平成6年6月30日

特許庁長官 麻生 渡 敬

1. 事件の表示 昭和63年特許願第160949号

2. 発明の名称 細胞接着活性ポリペプチド

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地

名 称 寶酒造株式会社

代表者 大 宮 久

(代表者変更)

4. 代 理 人

〒105

住 所 東京都港区西新橋3丁目15番8号

西新橋中央ビル302号 電話(3437)3467番

氏 名 井理士(7850) 中 本 宏

(ほか2名)

5. 補正命令の日付 自発補正

6. 補正により増加する請求項の数 1

7. 補正の対象

(1) 明細書の特許請求の範囲の欄

(2) 明細書の発明の詳細な説明の欄

8. 補正の内容

(1) 明細書の特許請求の範囲の欄を別紙のとおり補正する。

(2) 明細書の発明の詳細な説明の欄を下記のとおり補正する。

ア. 明細書第3頁10行の「チド・・・する。」なる全文を下

記のとおり補正する。

「チド、並びにそれらをコードする遺伝子、及びその遺伝子を用いた遺伝子工学的な製造方法に関する。」

イ. 同第7頁下から8～3行の「また・・・培養し、」なる全文を下記のとおり補正する。

「本発明の第2の発明は、第1の発明の一般式Iで表される細胞接着活性ポリペプチドをコードする遺伝子に関する。」

また本発明の第3の発明は前記一般式Iで表される細胞接着活性ポリペプチドをコードする遺伝子を含有せしめた組換え体プラスミドに関し、また本発明の第4の発明は前記組換え体プラスミドを導入せしめた形質転換体に関する。更に本発明の第5の発明は前記形質転換体を培養し、

ウ. 同第26頁4行の「ペプチ・・・法が」なる全文を下記のとおり補正する。

「ペプチド、並びにそれらをコードする遺伝子、及びその遺伝子を用いた遺伝子工学的な製造方法が」

2. 特許請求の範囲

1. 下記一般式 I :

Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly
 Pro Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro
 Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr Asn Phe Leu
 Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu
 Asp Val Ala Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser
 Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu Leu
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser
 Ser Val Tyr Glu Gln His Glu Ser Thr Pro
 Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp
 Ser Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile
 Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val His Trp Ile
 Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg
 Ile Arg His His Pro Glu His Phe Ser Gly
 Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His Ser
 Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr
 Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Ile Val
 Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu
 Leu Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp
 Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
 Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Asp
 Ala Pro Ala Val Thr Val Arg Tyr Tyr Arg
 Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser
 Pro Val Gln Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser

Lys Ser Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys
 Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr
 Ala Val Thr Gly Arg Gly Asp Ser Pro Ala
 Ser Ser Lys Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg
 Thr Glu Ile Asp ... (1)

で表されるアミノ酸配列で示されることを特徴とする細胞接着活性ポリペプチド。

2. 請求項 1 記載の細胞接着活性ポリペプチドをコードする遺伝子。

3. 請求項 2 記載の細胞接着活性ポリペプチドをコードする遺伝子を含むせしめた組換え体プラスミド。

4. 請求項 3 記載の組換え体プラスミドを導入せしめた形質転換体。

5. 請求項 4 記載の形質転換体を培養し、該培養物より請求項 1 記載の細胞接着活性ポリペプチドを採取することを特徴とする細胞接着活性ポリペプチドの製造方法。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.